

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszertechnológiai Intézet

INTRANAZÁLIS GYÓGYSZERBEVITEL LEGÚJABB GYÓGYSZERTECHNOLÓGIAI LEHETŐSÉGEI SZISZTÉMÁS HATÁS ELÉRÉSE CÉLJÁBÓL

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Kürti Levente

Témavezetők

Prof. Dr. habil. Révész Piroska, Pharm.D., D.Sc.

Dr. habil. Deli Mária, M.D., Ph.D.



Szeged
2012

**Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola**

**Gyógyszertechnológia Ph.D. program
Programvezető: Prof. Dr. Révész Piroska**

Gyógyszertechnológiai Intézet

Témavezetők

**Prof. Dr. habil. Révész Piroska, Pharm.D., D.Sc.
Dr. habil. Deli Mária, M.D., Ph.D.**

Dr. Kürti Levente

**INTRANAZÁLIS GYÓGYSZERBEVITEL LEGÚJABB
GYÓGYSZERTECHNOLÓGIAI LEHETŐSÉGEI
SZISZTÉMÁS HATÁS ELÉRÉSE CÉLJÁBÓL**

Szigorlati Bizottság

Elnök

Prof. Dr. Erős István, SZTE Gyógyszertechnológiai Intézet

Tagok

Dr. Bácskay Ildikó, DE Gyógyszertechnológiai Intézet

Dr. Gáspár Róbert, SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Bírálni bizottság

Elnök

Prof. Dr. Falkay György, SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Opponensek

Dr. Vastag Mónika, Richter Gedeon Nyrt.

Dr. Vecsernyés Miklós, DE Gyógyszertechnológiai Intézet

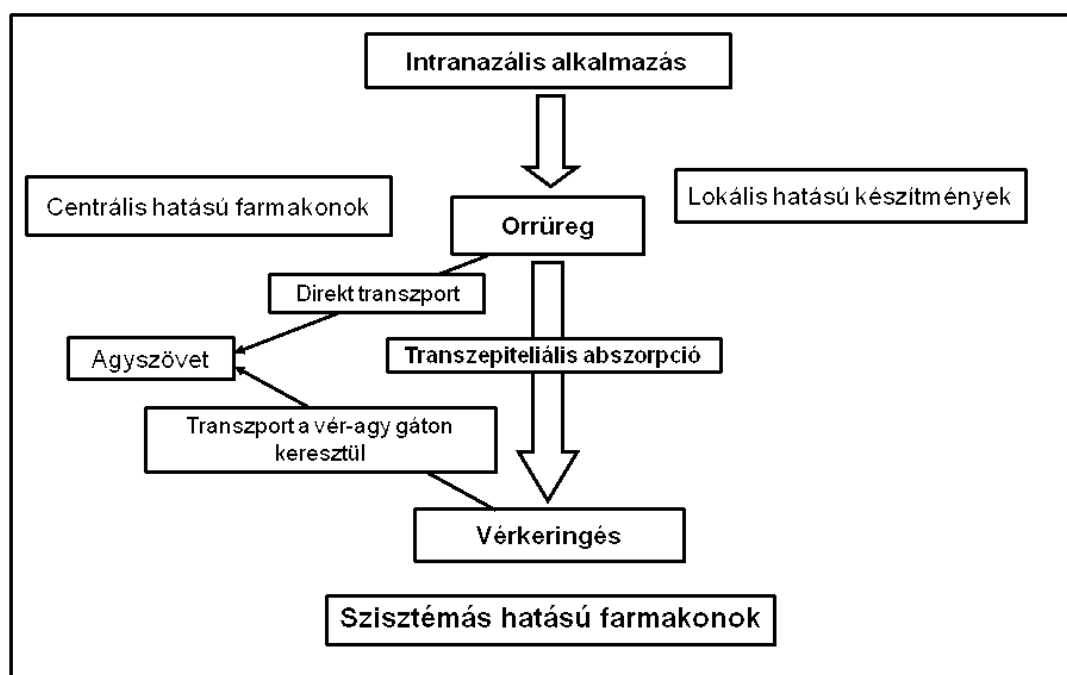
Tagok

Dr. Borsodi Anna, MTA SZBK Biokémiai Intézet

Dr. Hajdú Zsuzsanna, SZTE Farmakognóziai Intézet

1. BEVEZETÉS

A hatóanyagok nazális úton történő bejuttatása a szisztémás keringésbe egyre nagyobb figyelmet kap napjainkban. Az orrnyálkahártya számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik: nagy felszívódási felületet biztosít a gyógyszer abszorpcióhoz, gyors hatás érhető el, alternatív út lehetséges a vér–agy gát megkerülésével a központi idegrendszerbe és csökken a farmakonok first–pass metabolizmusa a májban. Sokféle hatóanyagot lehet bejuttatni nazális úton a szisztémás keringésbe, még olyan nagy molekulákat is, mint a peptidek és a fehérjék, különösen permeabilitást fokozó segédanyagok jelenlétében.



1. ábra. Intranazális gyógyszerbevitel lehetséges útjai. A nazálisan beadott hatóanyag egy része felszívódik a szisztémás keringésbe és kifejti terápiás hatásait, innen a vér–agy gáton keresztül elérheti a központi idegrendszert, illetve felhalmozódhat a szervekben, szövetekben, és eliminálódhat a szervezetből. A hatóanyag egy másik hányada a szaglóhámán keresztül a vér–agy gátat megkerülve közvetlenül juthat az agyszövetbe.

Nazális készítményekről először majdnem mindenkinek a lokális hatással rendelkező orrcseppek, orrkenőcsök jutnak eszébe. Az orrnyálkahártya felépítése azonban a vakcináció nazális lehetőségét is magában rejti, különösen a légúti infekciókkal szembeni védetség kialakításában lehetnek hatásosak (1. ábra).

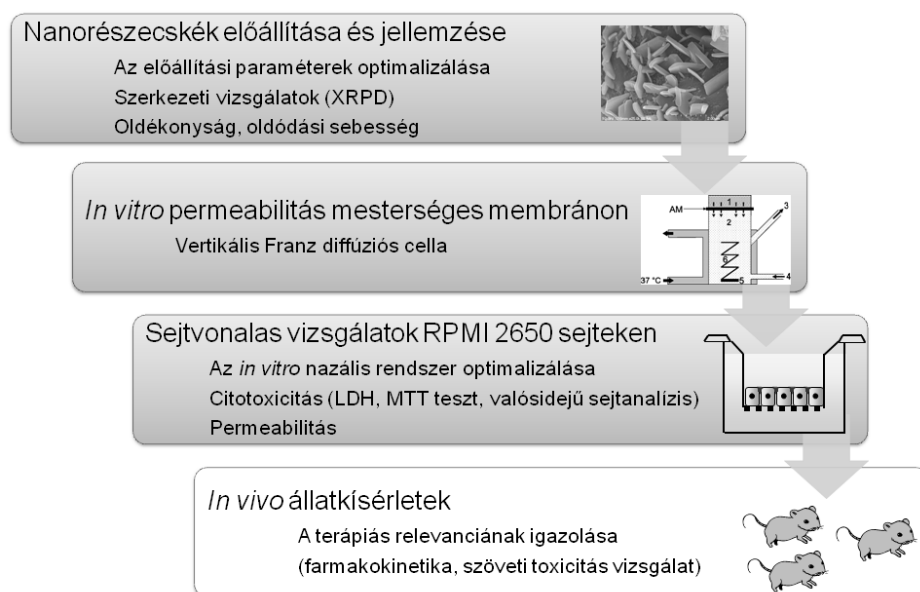
A szisztémás hatással rendelkező nazálisan alkalmazott gyógyszerek száma egyre növekszik. Olyan betegségek esetén érdemes ilyen készítményeket alkalmazni, amikor azonnali gyors hatásra van szükség (pl. sürgősségi fájdalomcsillapítás, epilepsziás görcsök), a betegség a bélmotilitást is érinti, így az enterális felszívódás változik, valamint amelyek

esetén hosszantartó gyógyszeres terápia szükséges és ezzel az egyszerű adagolási móddal növelhető lenne a beteg compliance (pl. diabetes mellitus, Parkinson-kór).

Új összetételek keresése és a megfelelő nazális gyógyszerformák fejlesztése számos ismert hatóanyagnak új indikációs területet nyithatna meg és sok farmakon-jelölt bejuttatási problémáit is megoldhatná.

2. CÉLKITŰZÉS

A hatékonyabb bejuttatás érdekében innovatív gyógyszer technológiai eljárásokkal és segédanyagok felhasználásával a hatóanyagok oldékonysága és a nazális epitéliumon való átjutása növelhető. Munkám célja az volt, hogy kifejlesszünk egy vizsgálati protokollt, amely alkalmas nazális gyógyszerkészítmények fizikai-kémiai, citotoxicitási és epitéliális permeabilitási vizsgálataira (2. ábra).



2. ábra. *Nazális vizsgálati protokoll lépései.*

A meloxicám nanorészecskék előállítását polimerek jelenlétében együttes őrlés technológiájával végeztük, a folyamat paramétereit optimalizáltuk és az optimalizált termékeket *in vitro* körülmények között vizsgáltuk.

A kozmetikai és élelmiszeriparban alkalmazott cukorészterek előnyös tulajdonságaik miatt előtérbe kerültek, mint lehetséges gyógyszerészeti segédanyagok. Azonban eddig az irodalomban nem állt rendelkezésre adat humán epitélsejtekre kifejtett toxikus hatásukról, illetve permeabilitást fokozó tulajdonságukról.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Modellanyagként rossz vízoldékonyságú hatóanyagot, meloxikámot (MEL) és nagy molekulatömegű paracelluláris markert, fluoreszcein-izotiocianáttal jelölt dextránt (FITC-dextrán, 4,4 kDa) alkalmaztunk.

3.1. Meloxikám nanorészecskék előállítása és jellemzése

MEL nanorészecskéket állítottunk elő polimerekkel való együttes őrlés technológiájával egy bolygómalomban (Fritsh Pulverisette 6). Az őrlési folyamat paramétereit optimalizáltuk (1. táblázat).

1. táblázat. Az együttes őrlés optimalizálandó paramétere

Meloxikám/ segédanyag arány	1:0,5; 1:1; 1:2
Segédanyagok	PVP–C30, PVP–K25, PEG 6000, PEG 20 000
Malom fordulatszáma (rpm)	200, 300, 400

Morfológiai vizsgálatok során pásztázó elektronmikroszkóppal (Hitachi S-4700 Type 2) készítettünk felvételeket a MEL részecskékről. Az elektronmikroszkópos képek elemzése „Image Processing and Analysis in Java” számítógépes program alkalmazásával történt. Faktoriális kísérlettervezéssel állítottuk be az optimális paramétereket.

3.2. Az optimalizált termékek vizsgálata

Porröntgen vizsgálat

A hatóanyag *kristályos jellegét* porröntgen diffraktométerrel határoztuk meg (Miniflex II Rigaku por-röntgen diffraktométer). Mérési paraméterek: Cu ($K_{\alpha}=1,5405 \text{ \AA}$), 30 kV, 15 mA.

Oldékonyság és oldódási sebesség

Az *oldékonysági* vizsgálatot foszfát pufferben (pH 7,4) végeztük el 37°C-on. Az oldatban lévő hatóanyagtartalmat 8 órás keverést követően szűrés és hígítás után spektrofotométerrel kapott abszorbanciák alapján határoztuk meg.

A meloxikám *kioldódását* a termékekből és fizikai keverékekből az Európai Gyógyszerkönyvben hivatalos forgólapátos kioldókészülékkel határoztuk meg. A méréseket Pharmatest forgólapátos kioldókészülékkel végeztem (100 rpm, 37 °C). A kioldó közeg 50 ml

foszfát puffer (pH 7,4) volt. A mintavételt követően, megfelelő hígítás után, a hatóanyag kioldódását spektrofotométerrel (Unicam UV/VIS spektrofotométer) detektáltuk.

3.3. Vertikális Franz diffúziós cella – *In vitro* permeabilitás

A membrán diffúziós és *in vitro* permeabilitási vizsgálatokat vertikális Franz diffúziós cellával (Hanson Microette TM Diffusion Cell System) végeztük. Donor fázisként 0,3 g mintát helyeztünk a szintetikus membránra (Porafil membránszűrő, cellulóz-acetát, pórusátmérő: 0,45 μm). A hatékony diffúziós felület 1,8 cm^2 volt. Akceptor fázisként 37 °C-ra termosztált foszfát puffert (pH 7,4) alkalmaztunk.

3.4. RPMI 2650 nazális epitelsejtek tenyésztése

Az RPMI 2650 (ATCC CCL 30) humán nazális epitelsejteket 5×10^5 sejt/ cm^2 sejtsűrűségben 0,05%-os patkányfarok kollagénnel bevont műanyag Petri-csészékben tenyésztettük 10% borjú savót tartalmazó tápfolyadékban, 37 °C-os inkubátorban, 5% CO_2 jelenlétében. A tápfolyadékot hetente háromszor cseréltük. A tenyészetek 3–4 nap alatt érték el a 80%-os konfluenciát, ekkor a sejteket tovább passzáltuk trypsin-EDTA oldat segítségével. A toxicitási kísérletekben a sejteket 96-lyukú steril tenyésztőlemezekben, míg a permeabilitási vizsgálatoknál 12-lyukú steril lemezek tenyésztőbetéteinek kollagénnel bevont, porózus polikarbonát membránjain (Transwell tenyésztőbetét, 0,4 μm pórusméret, 1,1 cm^2 tenyésztési felszín) tenyésztettük.

Elektronmikroszkópia

A polikarbonát membránokon tenyésztett RPMI 2650 sejteket fixáltuk. A mintákat a fixálás után háromszor mostuk kakodilát pufferben, majd kivágtuk a membránokat a tenyésztőbetétekből és 24-lyukú lemezbe helyezve utófixáltuk ozmium-tetraoxidban. Desztillált vizes mosást követően a mintákat felszálló alkohol sorral dehidratáltuk és uranil-acetátban inkubáltuk, majd Taab 812 beágyazószerrel blokkot készítettünk. Leica UCT ultramikrotóm segítségével ultravékony metszeteket készítettünk, amelyeket Hitachi 7100 transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltunk.

Immunhisztokémia

Kísérleteink során a nazális epitelsejtekben a ZO–1 és β –katenin sejtkapcsoló fehérjéket mutattuk ki immunfestéssel. A primer antitestek közül az anti-ZO–1 és az Alexa 488-kapcsolt anti-egér másodlagos ellenanyag az Invitrogentől, a β –katenin valamint a Cy3-kapcsolt anti-

nyúl szekunder ellenanyag pedig a Sigma–Aldrich, Magyarországtól származott. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz az RPMI 2650 sejteket 24-lyukú lemezekbe helyezett üveg fedőlemezekben tenyésztettük. A sejteket röviden és gyorsan mostuk, és fixáltuk. Újabb mosás után a sejteket borjú szérum albumin–PBS oldattal, majd a primer antitesttel, azután a szekunder antitesttel inkubáltuk. Minden lépés között háromszor mostuk a sejteket. Az utolsó lépés után a mintákat lefedtük és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Nikon Eclipse TE 2000 U).

Toxicitási vizsgálatok

Valós idejű sejtanalízis

Az xCELLigence rendszer (Roche) alkalmas a sejtenyészetek biológiai állapotának (növekedés, életképesség, adherencia) valós idejű nyomon követésére jelzőanyag használata nélkül. A műszer nagy előnye, hogy nem invazív, a sejtek monitorozása fiziológiai körülmények között zajlik. A műszer segítségével elektromos impedanciát mérhetünk a sejtek és az érzékelő elektródák között. A sejtek növekedésével és letapadásával arányosan nő a mért impedancia, amit a sejtindex értékével fejezünk ki.

Az impedancia méréshez a speciális 96-lyukú lemezeket 0,2%-os zselatin–PBS oldattal vontuk be. Ezt követően sejt-szuszpenziót adtunk lyukanként (6×10^3 sejt/lyuk) és a lemezt inkubátorba helyeztük. A műszer a mért impedanciát a sejtek kezeléséig 5 percenként, a kezeléseket követően pedig 2 percenként regisztrálta. Az RPMI 2650 sejteket a kirakást követő 20. órában MEL nanorészecskéket tartalmazó összetétellel és segédanyagokkal kezeltük. Az impedancia változását sejtindex és transzepiteliális ellenállás formájában fejeztük ki.

MTT festékredukciós teszt

A sejtek életképességének megállapítására a 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromidot (MTT) használtunk. Az élő sejtek a sárga MTT festéket kék színű formazán kristályokká alakítják. Az MTT teszthez az RPMI 2650 sejteket 96-lyukú steril lemezekben tenyésztettük, majd megkezeltük különböző összetételekkel és segédanyagokkal. A toxikus, illetve károsító hatás mértékével arányosan csökken a festék redukciója.

Laktát-dehidrogenáz felszabadulás meghatározása

A sejtekből felszabaduló citoplazmatikus laktát-dehidrogenáz (LDH) enzim a sejt-membrán károsodását jelzi, ezért a nekrotikus sejtpusztulás indikátoraként is használható. A

membránkárosító, nekrozist okozó hatás mértékével arányosan nő a felülúszóból mérhető LDH mennyisége, amit kolorimetriás módszerrel határoztunk meg (Roche kit).

Sejtmagok kettős fluoreszcens festése

Az nazális epitelsejtek magjának morfológiájában történő változást, a közvetlen toxicitást jelző élő és elpusztult sejtek arányát kettős fluoreszcens sejtmagi jelöléssel végeztük. A *bis*-benzimid fluoreszcens módon kékre festi a sejtmagokban a nukleinsavat az élő sejtekben is, míg az etidium homodimer-1 csak az elpusztult sejtek magját jelöli vörös fluoreszcenciával.

Permeabilitás vizsgálat

A MEL és a FITC-dextrán (4,4 kDa) epitelsejt rétegeken való átjutásának vizsgálatához az RPMI 2650 sejteket polikarbonát membránokra tettük ki adott sejtsűrűségben. A sejteket 2 nap után 300 µg/ml koncentrációjú retinsavval és 500 nM koncentrációjú hidrokortizonnal kezeltük, és egy nappal később végeztük a permeabilitás vizsgálatokat. A modellanyagok koncentrációját az alsó kompartmentből, a tenyésztőedény lyukaiban lévő oldatokból határoztuk meg. A tesztanyagok epitelsejteken való átjutását a látszólagos permeabilitási koefficiens (P_{app}) értékkel jellemeztük (Youdim és mtsai, Drug Discov. Today, 8, 997, 2003).

4. EREDMÉNYEK

4.1. Meloxicám nanorészecskék előállítása és vizsgálata

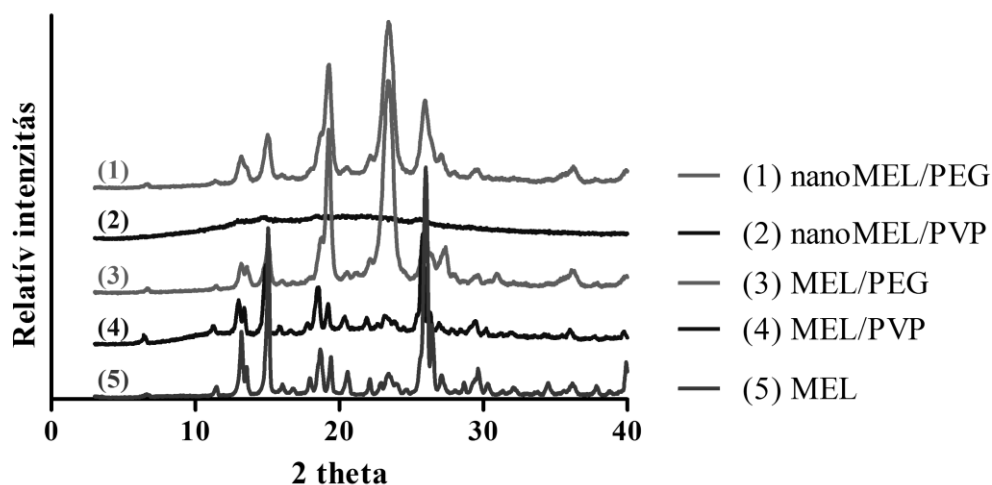
Az őrlési folyamat paramétereit optimalizálva faktoriális kísérlettervezés segítségével megkaptuk a részecskeméret-csökkentés szempontjából legkedvezőbb összetételeket (2. táblázat).

Az őrlésnek alávetett MEL a segédanyagoktól függően különböző szerkezeti változásokon megy keresztül. PVP C-30 tartalmú minták esetén őrlés hatására megváltozik a MEL habitusa és kristályossága. PVP K-25 tartalmú minták esetén csak részben változik a MEL kristályok habitusa. PEG tartalmú minták esetén a mintákban lévő MEL kristályszerkezete kevésbé törik le (3. ábra).

2. táblázat. Optimalizált termékek

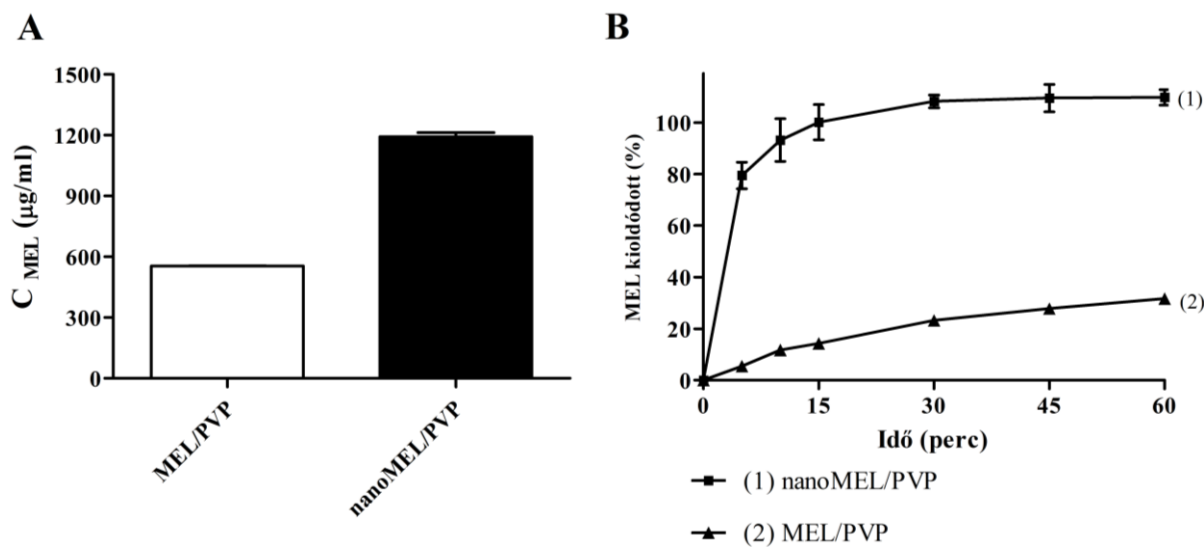
Őrlőanyag	Hatóanyag-őrlőanyag arány	Őrlési fordulatszám (rpm)	$d_{SEM} \pm SD$ (nm)
PVP-C30	1:1	400	140.4±69.2
PEG 6000	1:2	400	173.8 ± 60.3

A nanoMEL/PVP termékben amorf MEL nanorészecskéket állítottunk elő az elektron-mikroszkópos képek, valamint a röntgen-diffrakciós mérések eredményei alapján, ahol a hatóanyag jellegzetes csúcsai eltűntek (3. ábra).



3. ábra. Szerkezeti vizsgálatok, porröntgen diffrakciós mérések eredményei.

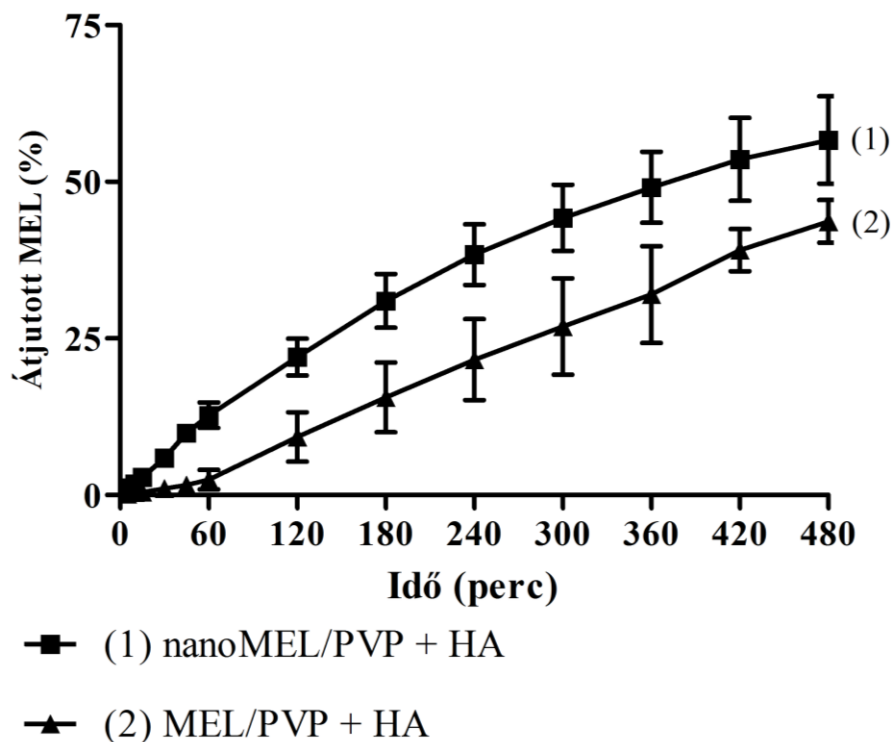
A nanoMEL/PVP termék oldódási tulajdonságait tovább vizsgálva megállapíthatjuk, hogy mind a termék oldékonysága, mind a kioldódás sebessége megnövekedett (4. ábra).



4. ábra. (A) Meloxikám oldékonyság vizsgálata, (B) Meloxikám oldódási sebesség meghatározása fiziológiás körülmények (pH 7,4; 37 °C) között foszfát pufferben. MEL/PVP, meloxikám és polivinilpirrolidin fizikai keveréke; nanoMEL/PVP, meloxikám és polivinilpirrolidin ko-őrölt termék.

Az intranazális alkalmazásra szánt folyékony összetétel a nanonizált hatóanyag mellett tartalmazott még nátrium-hialuronátot 5 mg/ml koncentrációban. A nazális készítmény *in*

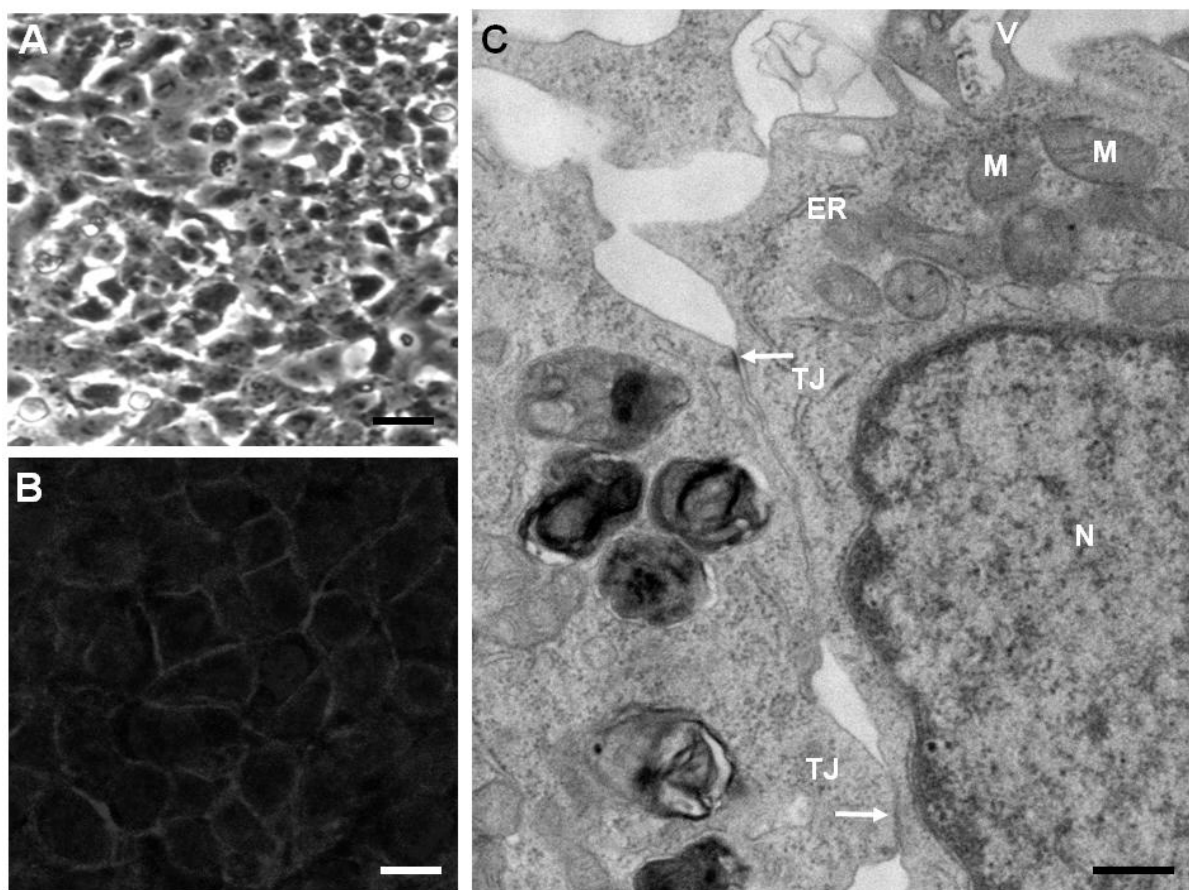
vitro permeabilitási tulajdonságait Franz diffúziós cellákon vizsgálva megállapíthatjuk, hogy a nanoMEL/PVP terméket tartalmazó összetételből gyorsabban jut át a hatóanyag a lipofil membránon keresztül (5. ábra).



5. ábra. Meloxicám *in vitro* permeabilitása mesterséges membránon keresztül különböző formulációk esetén. MEL/PVP, meloxicám és polivinilpirrolidin fizikai keveréke; nanoMEL/PVP, meloxicám és polivinilpirrolidin ko-őrölt termék; HA, nátrium-hialuronát.

4.2. RPMI 2650 humán nazális sejtvonal jellemzése

Kísérleteink eredményeképpen sikerült az RPMI 2650 nazális sejtvonal optimális tenyésztési körülményeit kidolgozni és olyan konfluens tenyészeteket létrehozni, amelyek alkalmasak további toxicitási és permeabilitási vizsgálatok elvégzéséhez. A fáziskontraszt és elektron mikroszkópos vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy az RPMI 2650 humán nazális sejtek egy, illetve több rétegben egymáshoz illeszkedve nőnek, alakjuk az epitél-sejtekre jellemzően hengeres. Az epitél-sejtek szerkezete és a sejtközi kapcsolatok láthatóak a 6. ábrán. A β -katenin kapcsolófehérje elsősorban a sejtek határán, az adherens junciókban lokalizálódik, de emellett citoplazmatikus festődés is megfigyelhető, ami összhangban áll a fehérje ismert jeltovábbító működésével.



6. ábra. (A) RPMI 2650 sejtenyészet fáziskontraszt mikroszkópos felvételen (mérce: 60 μm). (B) Konfokális mikroszkópos felvétel RPMI 2650 sejtekről. β -katenin immunfestés, sejtmag (mérce: 10 μm). (C) RPMI 2650 sejtek elektron mikroszkópos felvételen. M: mitochondrium, N: nucleus, ER: endoplazmatikus retikulum, TJ: tight junction, szoros kapcsolat (mérce: 250 nm).

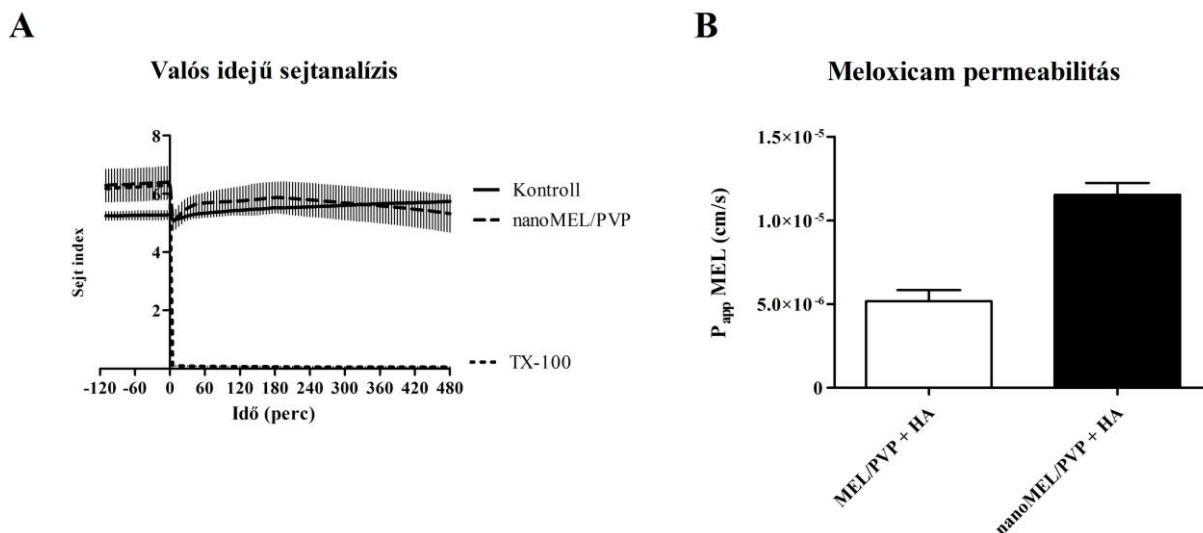
Igazoltuk elektronmikroszkópos vizsgálatok során (6. ábra), hogy az RPMI 2650 sejtek között nemcsak adherens junkciók, hanem az apikális régióban szoros sejtközi kapcsolatok is megtalálhatóak, melyek elengedhetetlen szerepet játszanak a sejtek barrier funkciójában. Az elektronmikroszkópos felvételen egészséges, ép sejtalkotókat, mint mitochondrium és endoplazmatikus retikulum láthatunk, és az epitelsejtekre *in vivo* is jellemző kevés citoplazmát nagy sejtmaggal.

A morfológiai vizsgálatok mellett funkcionálisan is igazoltuk, hogy a permeábilis membránon tenyésztett egybefüggő nazális epitelsejtrétegek barrieret alkotnak. Az RPMI 2650 sejtrétegek áteresztőképessége FITC-dextránra vizsgálva $9,7 \times 10^{-6}$ cm/s volt.

4.3. Meloxicám nanorészecskék átjutása nazális epitelsejtrétegeken

A MEL nanorészecskék biológiai hatásainak vizsgálatára *in vitro* körülmények között RPMI 2650 humán nazális epitelsejteket használtunk. Elsőként szereztünk új ismereteket a

nanoMEL/PVP termék citotoxicitási tulajdonságairól. A valós idejű sejtanalízis eredményei alapján látható a 7. ábrán, hogy a MEL nanorészecskéket tartalmazó összetétel nem toxikus a humán RPMI 2650 sejtekre. A hatóanyag permeabilitása a humán nazális epitelsejteken keresztül jelentősen gyorsabb volt a nanonizált MEL esetében.



7. ábra. (A) A valós idejű sejtanalízis a MEL nanorészecskék toxicitásáról szolgál információval, (B) A nazális készítmény permeabilitási együtthatója RPMI 2650 nazális epitelsejt modellen. MEL/PVP, meloxikám és polivinilpirrolidin fizikai keveréke; nanoMEL/PVP, meloxikám és polivinilpirrolidin ko-őrölt termék

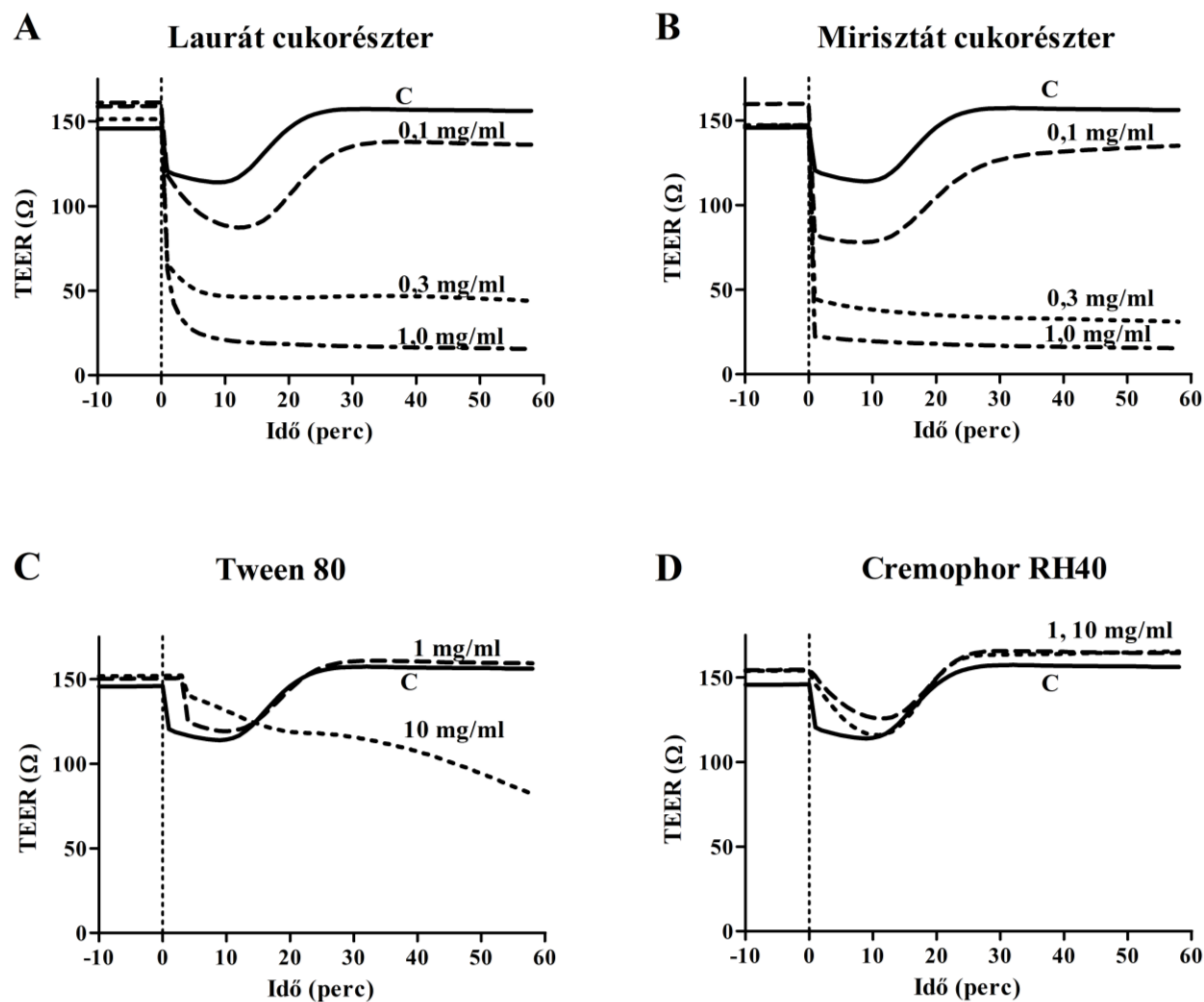
4.4. Cukorészterek hatása a nazális epitelsejtekre: toxicitási és permeabilitási tesztek

A permeabilitást fokozó segédanyagok hatását valós idejű sejtanalízis segítségével is leteszteltük RPMI 2650 sejteken (8. ábra). A kezelés után 1 órával a Cremophor RH40 egyetlen vizsgált dózisa sem okozott sejtinдекс csökkenést, ami arra utal, hogy nem történt sejtkárosodás. A Tween 80 1 mg/ml koncentrációban nem volt káros, de 10 mg/ml-es koncentrációban már 40% alá csökkent a sejtinдекс. Mivel az 1 órás LDH tesztben nem volt membránkárosodás ennél a dózissnál, ezért az impedancia csökkenése paracelluláris permeabilitás növekedésre utalhat.

A laurát és a mirisztát cukorésztereket vizsgálva a 0,1 mg/ml-es koncentrációk esetében 80% fölötti sejtinдексet kaptunk 1 órás kezelés után. A nagyobb 0,3 és az 1 mg/ml dózisok alkalmazása azonban 20% illetve 2%-os sejtinдексet eredményezett, ami a Triton X-100 kezeléssel megegyező, jelentős sejtkárosodást hozott létre.

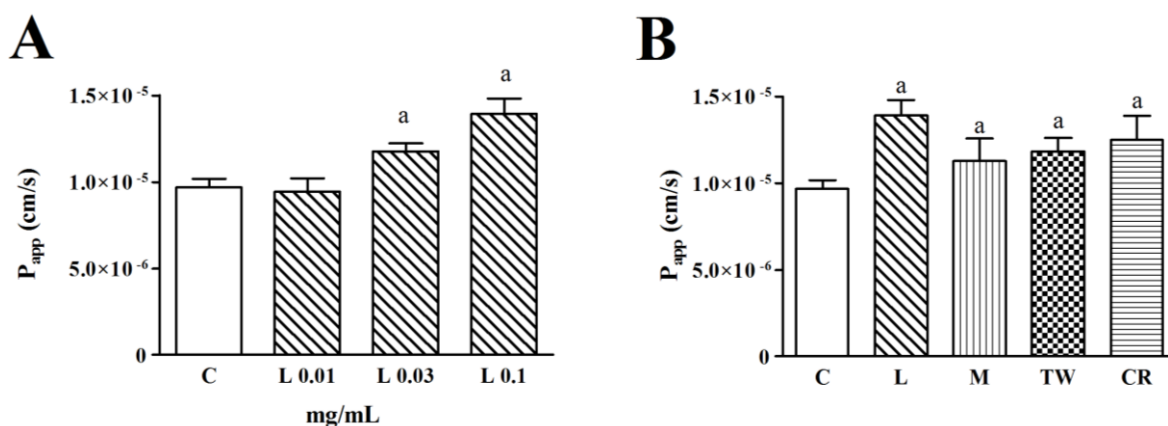
A permeabilitást fokozó segédanyagokkal történő kezelést követően minden esetben megfigyeltünk egy azonnali impedancia csökkenést, ami reverzibilisnek bizonyult az alacsonyabb, a megelőző kísérletekben bizonyítottan nem toxikus koncentrációkban (8. ábra). A Cremophor RH40 esetében egyik vizsgált koncentrációnál sem, míg a Tween 80-nál a

10 mg/ml-es dózisban tapasztaltunk TEER csökkenést. A cukorészterek esetében a 0,3 és az 1 mg/ml koncentrációk jelentős rezisztencia csökkenést eredményeztek. A magasabb koncentrációk esetén tapasztalt irreverzibilis rezisztencia csökkenés sejtkárosító hatásra utal, ami összhangban áll a toxicitási kísérletekben kapott eredményeinkkel.



8. ábra. Az RPMI 2650 nazális epitelsejrétegek transzepiteliális ellenállásának (TEER) változása cukorészterek és referencia vegyületek hatására. C, kontroll.

A vizsgált cukorészterek esetében azt tapasztaltuk, hogy a bizonyítottan nem káros 0,1 mg/ml-es koncentrációban a kontrollhoz képest alacsonyabb TEER értékeket kaptunk, ami paracelluláris permeabilitás fokozódást jelent.



9. ábra. FITC-dextrán (4,4 kDa) permeabilitási együttható humán RPMI 2650 nazális epitelsejt modellen. C, kontroll; CR, Cremophor RH40; L, laurát cukorészter; M, mirisztát cukorészter; P_{app} , látszólagos permeabilitási együttható; TW, Tween 80.

A nazális epitelsejtrétegek áteresztőképességének meghatározásához a paracelluláris marker molekula FITC-dextránt használtuk. A laurát cukorészter a korábbi kísérletekben meghatározott nem toxikus koncentrációkban alkalmazva dózisfüggő módon megnövelte az epitelsejtek FITC-dextrán permeabilitását (9. ábra). Egy órás 0,1 mg/ml laurát cukorészter kezelés 50%-kal növelte a sejtrétegek áteresztőképességét, így ez a dózis hatásosan fokozta a permeabilitást. Ez az eredmény összhangban áll a valós idejű sejtanálízisnél megfigyelt impedancia csökkenéssel.

Összehasonlítva a Chremophor RH40 és Tween 80 referencia segédanyagok, valamint a laurát és mirisztát cukorészterek azonos koncentrációban (0,1 mg/ml) epitelsejtek permeabilitására kifejtett hatását azt tapasztaltuk, hogy az összes vizsgált segédanyag fokozta az RPMI 2650 sejtek permeabilitását, de közülük a laurát cukorészter növelte a legnagyobb mértékben.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Megállapíthatjuk, hogy kutatómunkánk során sikerült egy olyan vizsgálati protokollt kidolgozni, amely alkalmas nazális gyógyszerkészítmények fizikai-kémiai, *in vitro* permeabilitási, citotoxicitási és epitelsejteken történő permeabilitási vizsgálataira.

Meloxicám nanorészecskéket állítottunk elő polimerekkel történt együttes őrlés technológiájával. Az előállítási folyamatot optimalizáltuk. Az optimalizált termékekből a nanoMEL/PVP összetétel bizonyult a legjobbnak, a hatóanyag oldékonysága és oldódási sebessége egyaránt megnövekedett.

A humán RPMI 2650 nazális epitelsejtek tenyésztési körülményeinek optimalizálásával sikerült egy sejttenyészetes modellt kidolgoznunk, amely alkalmas intranazális hatóanyag bevitel vizsgálatára, és elsőként igazoltuk ezen a modellen a meloxicam nanorészecskék átjutását és a cukorészterek toxicitásának és permeabilitást fokozó tulajdonságának mértékét.

Eredményeink alapján az amorf meloxicam nanorészecskéket tartalmazó nazális összetétel és a cukorészterek, mint innovatív segédanyagok terápiás relevanciával rendelkezhetnek. A kidolgozott vizsgálati protokoll hozzájárulhat nazális gyógyszerkészítmények kifejlesztéséhez.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

- I.** Kürti L., Deli M., Szabóné Révész P.
Intranazális gyógyszerbevitel újabb lehetőségei szisztémás hatás elérése céljából
Gyógyszerészet 53, 67–73 (2009)
IF: -
- II.** Kürti L., Kukovecz Á., Kozma G., Ambrus R., Deli M.A., Szabó–Révész P.
Study of the parameters influencing the co-grinding process for the production of meloxicam nanoparticles
Powder Technology 212, 210–217 (2011)
IF: 1,887 (2010)
- III.** Kürti L., Veszelka S., Bocsik A., Dung N.T.K., Ózsvári B., Puskás L.G., Kittel Á., Szabó–Révész P., Deli M.A.
The effect of sucrose esters on a culture model of the nasal barrier
Toxicology in Vitro 26, 445–454 (2012)
IF: 2,546 (2010)
- IV.** Kürti L., Veszelka S., Bocsik A., Dung N.T.K., Ózsvári B., Puskás L.G., Kittel Á., Szabó–Révész P., Deli M.A.
Retinoic acid and hydrocortisone strengthen the barrier function of human RPMI 2650 cells, a model for nasal epithelial permeability
Cytotechnology (benyújtva 2012. január 18-án, kézirat száma: CYTO700)
- V.** Kürti L., Bocsik A., Veszelka S., Ózsvári B., Puskás L.G., Csizmazia E., Csányi E., Deli M.A., Szabó–Révész P.
In vitro permeability screening of meloxicam nanoparticles for nasal delivery
(kézirat)

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

- I.** Horvát S., Fehér A., Balogh G., Wolburg H., Veszelka S., Kurunczi A., Kürti L., Erős I., Szabó–Révész P., Deli M.A.
Sodium hyaluronate as a mucoadhesive component in nasal formulation enhances delivery of molecules to brain tissue.
European Journal of Pharmeceutics and Biopharmaceutics 72, 252–259 (2009)
IF: 4,304 (2010)
- II.** Sipos E., Kurunczi A., Fehér A., Penke Z., Fülöp L., Kasza Á., Horváth J., Horvát S., Veszelka S., Balogh G., Kürti L., Erős I., Szabó–Révész P., Párducz Á., Penke B., Deli M.A.
Intranasal delivery of human β -amyloid peptide in rats: effective brain targeting
Cellular and Molecular Neurobiology 30, 405–413 (2010)
IF: 2,423 (2010)

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ ELŐADÁSKIVONATOK

Szóbeli előadások

Kürti L.

Hatóanyagok központi idegrendszerbe irányuló transzportjának vizsgálata intranazális alkalmazás esetén

Szegedi Tudományegyetem, Tudományos Diákköri konferencia, Szeged, 2007. február 8.

Kürti L.

Intranazális gyógyszerbevitel újabb lehetőségei szisztémás hatás elérése céljából

Magyar tudomány napja, Szeged, 2009. november 10.

Kürti L., Kis L., Veszelka S., Szabó–Révész P., Deli M.A.

A model for studying nasal drug delivery: RPMI 2650 human nasal epithelial cell line

8th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Graz, Ausztria, 2010. szeptember 16–18. *Sci. Pharm.* 2010; 78: 579. Conference abstract LNT05

Kürti L., Veszelka S., Szabóné Révész P., Deli M.

Nazális gyógyszerbevitel modellezése: *in vitro* sejtvonalas vizsgálatok

XVI. Országos Gyógyszertechnológiai Konferencia, Siófok, 2010. október 20–22.

Kürti L., Veszelka S., Kittel Á., Szabóné Révész P., Deli M.

RPMI 2650 humán nazális epitelsejtvonalon alapuló modell létrehozása gyógyszerbevitel tesztelésére

Magyar Mikroszkóp Társaság szokásos évi konferenciája, Siófok, 2011. május 19–21.

Kürti L.

Intranazális gyógyszerbevitel szisztémás hatás elérése céljából: nanorészecskék és permeabilitásfokozók

X. Clauder Ottó Emlékverseny, Budapest, 2011. október 13–14.

Kürti L.

Nanorészecskék az intranazális gyógyszerbevitelben

XVIII. Szent-Györgyi Napok, „Életfolyamatok és szabályozásuk”; a SZTE Általános Orvostudományi, Gyógyszerésztudományi és Fogorvostudományi Karai Doktori Iskoláinak tudományos konferenciája, Szeged, 2011. november 18.

Poszter prezentációk

Kürti L., Ambrus R., Kónya Z., Kozma G., Kukovecz Á., Kiricsi I., Deli M., Szabóné Révész P.

Meloxicam nanorészecskék előállítása ko-örlés technológiájával intranazális gyógyszerbevitel céljából

XIV. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, Budapest, 2009. november 13–15.

Kürti L., Kukovecz Á., Kozma G., Ambrus R., Deli M.A., Szabó–Révész P.

Preparation of meloxicam nanocrystals by cogrinding process: optimization of the influencing parameters by factorial experiment design

6th PhD Symposium, Medical University of Vienna, Bécs, Ausztria, 2010. június 16–17.

Kürti L., Kis L., Bocsik A., Veszelka S., Szabó–Révész P., Deli M.A.

A model for studying nasal drug delivery: RPMI 2650 human nasal epithelial cell line

Straub napok, Szeged, 2010. december 1–2.

Kürti L., Veszelka S., Kittel Á., Szabóné Révész P., Deli M.

Nazális gyógyszerbevitel modellezése: *in vitro* sejtvonalas vizsgálatok RPMI 2650 humán nazális epitelsejteken

41. Membrán–Transzport Konferencia, Sümeg, 2011. május 17–20.

Kürti L., Veszelka S., Ambrus R., Szabó–Révész P., Deli M.A.

Possibilities for overcoming the nasal epithelial barrier: nanoparticles and permeability enhancers
ITC Alumni Conference on “Multidisciplinary Approaches to Biological Problems”, Szeged, 2011. szeptember 1–3.

Kürti L., Bocsik A., Veszelka S., Deli M.A., Szabó–Révész P.

In vitro permeability screening of meloxicam nanoparticles for nasal delivery

8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Isztambul, Törökország, 2012. március 19–22.

Kutatási támogatás

A TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0005 azonosító számú, „Kutatóegyetemi Kiválósági Központ létrehozása a Szegedi Tudományegyetemen” című projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósul meg; Richter Gedeon Centenárium Alapítvány és OTKA-NNF 78920 projekt anyagi támogatásával.